

自己免疫性出血症治療の「均てん化」のための実態調査と「総合的」診療指針の作成
に関する研究

分担研究課題 実験の実施（主に XIII/13 因子抗体症例）:

自己免疫性凝固第 XIII/13 因子欠乏症 (AiF13D)、自己免疫性凝固第 VIII/8 因子欠乏症 (AiF8D)、
自己免疫性後天性フォンヴィルブランド因子欠乏症 (AiVWFD)の自己抗体検出

研究分担者 尾崎 司 山形大学大学院医学系研究科 助教

研究要旨

自己免疫性凝固第 XIII/13 因子 (F13) 欠乏症 (AiF13D; 厚労省指定難病 288-1) 疑い 10 症例についてイムノクロマト法を用いて確定診断を行い、新たに 3 例を同定した。自己免疫性凝固第 VIII/8 因子 (F8) 欠乏症 (AiF8D; 厚労省指定難病 288-2) 疑い 1 症例について市販の ELISA キットを用いて確定診断を行い、新たに 1 例を同定した。自己免疫性後天性フォンヴィルブランド因子 (vWF) 欠乏症 (AiVWFD; 厚労省指定難病 288-3) 疑い 1 症例についてイムノクロマト法による自己抗体の検出を試みたが陰性だった。

自己免疫性凝固第 IX/9 因子 (F9) 欠乏症 (AiF9D) 患者は確認されていないが、検査体制を確立するために、F9 を固相化したプレートを用いて血友病 B インヒビター症例の同種抗体を検出することに成功した。同様な手法で AiF9D 疑い症例について自己抗体の検出は可能であると考えられる。

A . 研究目的

自己免疫性後天性凝固因子欠乏症は AiF13D、AiF8D、AiVWFD、AiF5D からなる難治性出血性疾患である。それぞれ F13、F8、vWF、F5 に対する自己抗体が原因で出血傾向を来す疾患である。

これら自己免疫性後天性凝固因子欠乏症の総合的な診断基準・重症度分類、診療指針等の作成を最終的な目的として実態把握のため、AiF13D 疑い 10 症例、AiF8D 疑い 1 症例、AiVWFD 疑い 1 症例についてイムノクロマト法、あるいは ELISA 法によって確定診断を行った。

また、F9 など他の凝固因子に対する自己抗体が原因の症例も存在する可能性があり、実態把握のためには診断法の確立が必要である。

B . 研究方法

イムノクロマト法による抗 F13 自己抗体の検出

イムノクロマト法は抗 F13A サブユニット (F13-A) モノクローナル抗体を塗布したストリップを用いた。希釈血漿、洗浄液、金コロイド標識抗ヒト Ig (G+M+A) 抗体希釈溶液を順次展開した (直接法)。陽性コントロールの吸光度を 1 とした時の吸光度 0.18 をカットオフ値に設定し、判定を行った。F13 抗原量が極端に少ない症例での偽陰性を避けるために、健常人血漿と 37 °C で 5 分間混合後の検体についてもイムノクロマト法を実施した (混合法)。

ELISA キットによる F8 抗原量の測定、および抗 F8 自己抗体の検出

市販の ELISA キットを用いて F8 抗原量の測定、

および遊離の抗 F8 自己抗体の検出を行った。抗 F8 自己抗体の有無は説明書に従って判定した。

F8 活性、および F9 活性の測定

合成基質法を測定原理として用いた市販のキットにより、F8 活性を測定した。市販の標準血漿 (コアグトロール N) の活性を 100% として算出した。

F8 インヒビターの力価の測定は、56 °C、30 分で非働化した検体を生理食塩水で希釈し、等量の標準血漿と混合し、37 °C、2 時間反応後、上述の方法で残存する F8 活性を測定した。等量の生理食塩水と標準血漿を混合後の F8 活性と比較して 50% 失活した場合を 1 BU/mL とした。

イムノクロマト法による抗 vWF 自己抗体の検出

遊離の抗 vWF 自己抗体は市販の精製 vWF を塗布したストリップを用いた。希釈血漿、洗浄液、金コロイド標識抗ヒト Ig (G+M+A) 抗体希釈溶液を順次展開した (直接法)。陽性コントロールの吸光度を 1 とした時の吸光度 0.18 をカットオフ値に設定し、判定を行った。

vWF-抗 vWF 自己抗体抗原抗体複合体の検出のために 2 種類の抗 vWF モノクローナル抗体をそれぞれ塗布したストリップを用いた。vWF 抗原量が極端に少ない症例での偽陰性を避けるために、vWF (40 µg/mL) と患者血漿を 1:1 で混合後、37 °C で 1 時間反応後の検体のイムノクロマト法を実施した (混合法)。

自家製 ELISA 法による抗 F9 同種抗体の検出

遊離の抗 F9 同種抗体は市販の精製 F9 をプレートに固相化して測定した。F9 を固相化したプレートに希釈検体を入れ、結合した抗 F9 同種抗体をペルオキシダーゼ標識抗ヒト Ig (G+M+A) 抗体と TMB により検出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、山形大学の倫理委員会の承認を得ており、検体使用に関しては、各主治医が症例あるいはその家族から文書による同意を得ている。

C. 研究結果

AiF13D の確定診断

AiF13D 疑い 10 症例について直接法、混合法を実施し、判定を行ったところ、3 例は直接法、混合法いずれも陽性、7 例は直接法、混合法いずれも陰性であった。

AiF8D の確定診断

AiF8D 疑い 11 症例について市販の ELISA キットを用いて自己抗体の有無を判定したところ、陽性であった。F8 抗原量は 0.96 IU/mL、F8 活性は 10% で F8 比活性は 0.10 であった。また、インヒビター力価は 3.5 BU/mL だった。

AiVWFD の確定診断

AiVWFD 疑い 11 症例についてイムノクロマト法を用いて自己抗体の有無を判定したところ、遊離型、複合体型とも陰性であった。

血友病 B インヒビター症例の抗 F9 同種抗体検出

血友病 B インヒビター疑い 1 症例について ELISA 法を用いて同種抗体の検出を行ったところ、インヒビター力価と抗体量の増減に相関が認められた。

抗 F13B サブユニット自己抗体検出 ELISA の改良

横山研究分担者から提供されたラット抗 F13B サブユニットモノクローン抗体を用いて AMED プロジェクトで開発した抗 F13B サブユニット自己抗体検出 ELISA システムを高感度化することに成功した。

D. 考察

AiF13D 疑い 10 症例のうちイムノクロマト陽性だった 3 例のうち 2 例は、抗 F13-A 自己抗体検出のための ELISA 法、ドットプロット法でも陽性だった。1 例はドットプロット法で陰性だったが、ELISA 法で自己抗体が検出されており、イムノクロマト法は迅速診断に有用であると考えられる。

AiF8D 疑い 11 症例は自己抗体が検出されたので AiF8D と確定した。F8 抗原量は正常範囲内だったが、F8 活性、比活性ともに低値を示し、混合試験で弱いながらも阻害が認められたので中和型抗体が存在していると考えられる。

AiVWFD 疑い 11 症例は自己抗体が検出されなかったが、vWF 抗原量が低値を示していたので残存自己抗体量は極めて少ないが、クリアランスされている可能性は考えられる。

血友病 B インヒビター症例の同種抗体量とイン

ヒビター力価に相関が認められたことから、自家製 ELISA はある程度正確に測定出来ており、今後出てくる可能性のある AiF9D 疑い症例の診断に有用であると考えられる。

E. 結論

AH13 疑い症例の自己抗体の検出については現行のイムノクロマト法が有用であると考えられるが、特に F13B に対する自己抗体については感度の問題で偽陰性になる可能性も考慮に入れる必要がある。同様に抗 vWF 自己抗体検出についても感度の問題で偽陰性になる可能性はあるので改良が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著

1. Yokoyama C, Ikeda S, Osaki T, Souri M, Ichinose A. Generation and Application of Rat Monoclonal Antibodies Specific for a Human Blood Coagulation Protein: von Willebrand Factor. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 2019; 38(3):133-136

2) 総説・著書

なし

.学会発表

1) 特別講演等

なし

2) 一般演題

1. 尾崎司, 惣宇利正善, 一瀬白帝: 厚労省指定難病 288 自己免疫性凝固因子欠乏症 (AiCFD) 関連疾患の病態検査. 東北ヘマトロジーネットワーク - クセミナー 2019, ホテルメトロポリタン仙台 (仙台市青葉区); 2019 年 9 月 1 日
2. 尾崎司, 惣宇利正善, 佐藤裕子, 三井哲夫, 一瀬白帝: 血液凝固第 V/5 因子、第 IX/9 因子インヒビターの分子病態学的解析. 第 5 回山形県血液研究会, 山形国際ホテル (山形市); 2019 年 11 月 8 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1). 特許取得

なし

2). 実用新案登録

なし

3). その他

なし

令和2年3月11日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 山形大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 小山 清人 印



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業
2. 研究課題名 自己免疫性出血症治療の「均てん化」のための実態調査と「総合的」診療指針の作成
3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院医学系研究科・助教
(氏名・フリガナ) 尾崎 司・オサキ ツカサ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	山形大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	山形大学	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。